

产甘油假丝酵母胞浆 3-磷酸甘油脱氢酶编码基因的克隆*

王正祥 诸葛健

(无锡轻工大学生物工程学院遗传育种研究室 无锡 214036)

摘 要 当酵母细胞处于高渗透压环境时,甘油被诱导合成以提高其胞内渗透压,这一过程受 HOG 途径的调控。GPD1 基因为 HOG 途径的重要靶基因,高效表达使胞内 3-磷酸甘油脱氢酶酶活水平提高可极大地提高甘油的产量。本研究将产甘油假丝酵母(*Candida glycerolgenesis*)染色体 DNA 经 *Sau3AI* 部分酶解后的 5~10kbDNA 片段与经 *Bam*HI 线性化及 CIP 处理过的酵母-大肠杆菌穿梭质粒 YEp51 连接,以大肠杆菌 DH5 α 为受体,构建产甘油假丝酵母的染色体基因文库。通过遗传互补法,在含 50g/L 氯化钠的培养基上筛选出 15 个转化子,对转化子 0601 进行了进一步鉴定,转化子 0601 所含质粒 YEp0601 带有 YEp51 的标记并可以消除 *Saccharomyces cerevisiae*642 菌株由于其 GPD1, GPD2 两基因的缺失突变而表现出的渗透压敏感性,表明已克隆到产甘油假丝酵母的编码胞浆 3-磷酸甘油脱氢酶的基因。

关键词 产甘油假丝酵母, 3-磷酸甘油脱氢酶基因, 克隆

分类号 Q939.5 **文献标识码** A **文章编号** 0001-6209(1999)04-0321-26

置于高渗溶液活细胞,为了适应胞外环境降低的水活度以及由此而导致的细胞膨胀压的降低,细胞通过合成和/或积累渗透压保护性组分来维持这一压力。由于微生物生理与正常代谢要求微生物胞内环境如离子组成、pH、代谢物浓度等相对稳定,因此微生物不可能将绝大多数的代谢产物和无机盐离子用作渗透压调节剂,如此,置身于高渗环境中的微生物细胞必须合成和/或积累高浓度的无毒性(相容性)特殊溶质^[1~4]。已发现的重要的相容性溶质有 K⁺^[5,6]、谷氨酸^[7]、谷氨酰胺^[8]、脯氨酸和脯氨酸三甲氨内酯^[9]、海藻糖^[10]、甘氨酸三甲氨内酯^[11]、多元醇(包括甘油、甘露醇、赤藓醇和阿拉伯糖醇)^[12]等。其中 K⁺^[5,6]是原核微生物,如大肠杆菌,最主要的相容性溶质;多元醇特别是甘油则是酵母和类酵母真菌的最主要的相容性溶质^[12~14]。

当酵母细胞处于高渗透压环境中时,甘油被诱导合成以提高其胞内渗透压,这一过程受高渗甘油应答途径,即 HOG 途径的调控^[15,16]。HOG 途径中已被鉴定的两个基因为 PBS2 和 HOG1,为酵母细胞在高渗透压环境中生长所必需。已被克隆的 HOG 途径的靶基因有 GPD1 和 CTT1, GPD1 基因编码一种 NAD⁺ 依赖性 3-磷酸甘油脱氢酶(GPDH), CTT1 基因编码胞浆过氧化氢酶 T,两者皆受高渗环境的诱导而表达^[17]。将基因 GPD1 在酿酒酵母中高效表达使胞内 3-磷酸甘油脱氢酶酶活水平提高,大大地提高甘油的产量^[18]。

本文报道 *Candida glycerolgenesis* 甘油合成途径中关键酶——胞浆 3-磷酸甘油脱氢酶的编码基因的克隆。

* 国家“九五”攻关项目(No. 96-C03-03-03)

收稿日期:1998-02-23,修回日期:1998-06-01

1 材料和方法

1.2 菌株与质粒

本文所使用的菌株和质粒见表 1。

表 1 菌株和质粒
Table 1 Strains and plasmids

菌株和质粒 Strain and plasmid	遗传标记 Genotype	来源 Source
<i>C. glycerolgenesis</i>		本研究室 ^[19]
<i>S. cerevisiae</i> W303-1A	MATa <i>leu ura trp his ade can 1-100</i>	Dr. Hohmann ^[17]
<i>S. cerevisiae</i> 392	W303-1A(202) <i>gpd1Δ::TRP1</i>	Dr. Hohmann ^[17]
<i>S. cerevisiae</i> 482	W303-1A MATa <i>gpd1Δ::TRP1 hog1Δ::TRP1</i>	Dr. Hohmann ^[17]
<i>S. cerevisiae</i> 642	W303-1A(202) <i>gpd1Δ::TRP1 gpd2Δ::URA3</i>	Dr. Hohmann ^[17]
<i>E. coli</i> DH5a	<i>supE44 ΔlacU169 (φ80 lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 re1A1</i>	陈永青 教授
YEp51	LEU2 ⁻ , Amp ^r	李育阳 教授
YEp0601	LEU2 ⁻ , Amp ^r , <i>GPD</i> gene of <i>C. glycerolgenesis</i>	This work

1.2 产甘油假丝酵母高分子量染色体 DNA 的制备

产甘油假丝酵母 WL2002-5 染色体 DNA 的制备按文献[20~21]加以改进。

1.3 染色体 DNA 部分酶切与特定片长 DNA 的制备浓度的确定

以最适酶量的 *Sau*3AI(Promega)消化 100 μ g 纯化的染色体 DNA。用密度梯度离心法制备 5~10 kb 及 10~20 kb DNA 片段^[21]。

1.4 基因文库的组建

将去除 5' 端磷酸的载体 DNA 与插入 DNA 以 2:1 混合,加入连接缓冲液、T4 连接酶(Promega)、ATP(Fluka),混合后于 15 $^{\circ}$ C 反应 4h。将连接混合物转化感受态大肠杆菌 DH5a。转化混合物在添加 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 SOB 平板上涂布,37 $^{\circ}$ C 培养 12~14 h 后收集转化子,分装后于 -70 $^{\circ}$ C 保存(图 1)。

1.5 基因文库的初步鉴定

随机从基因文库中取出 1 支保藏物在含 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 平板上划线,随机挑选单菌落作质粒提取与鉴定。

1.6 载运 DNA 的制备

将小牛胸腺 DNA 用 10mmol/L TE 缓冲液溶解,加入 0.1mg/L 的 RNA 酶,37 $^{\circ}$ C 处理 2 h;加入 0.1mg/L 蛋白酶 K 于 45 $^{\circ}$ C 处理 1h。水饱和酚抽提后,DNA 溶液用超声波破碎机于 300W 超声破碎 30s 制备片段长在 1~2kb 的 DNA 片段,终浓度为 10 μ g/ μ L。

1.7 基因文库的扩增与重组质粒的纯化^[21]

1.8 酵母细胞转化^[22,23]

2 结果

2.1 质粒基因文库的构建

以 YEp51 为载体,体外连接后转化感受态大肠杆菌 DH5a,构建成库容为 5×10^5 的

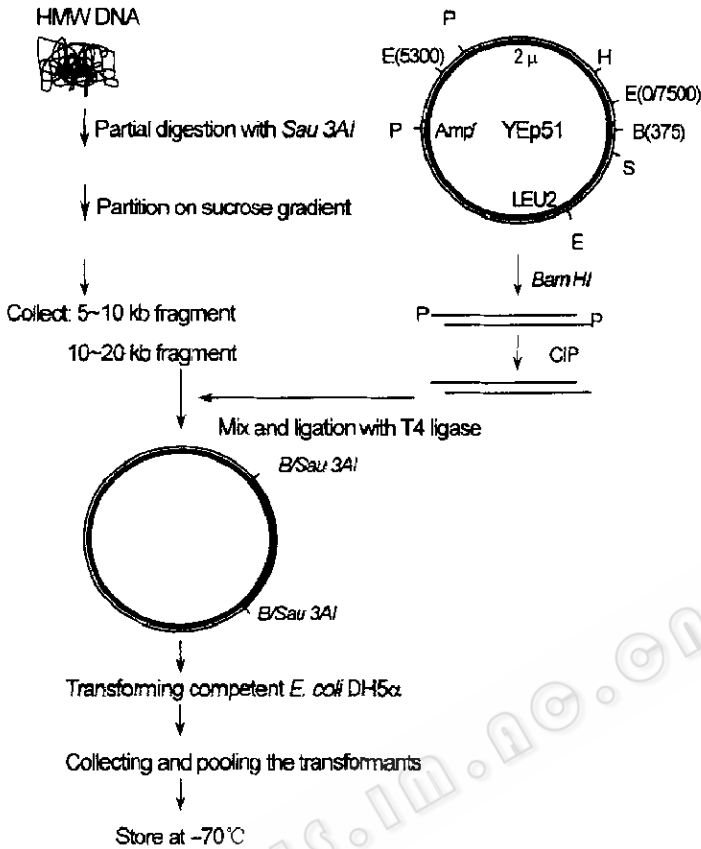


图 1 基因文库的构建步骤

Fig. 1 Procedure for construction of gene bank

B: *Bam* HI; E: *Eco* RI; H: *Hind* III; P: *Pst* I; S: *Sal* I.

基因文库。假丝酵母的基因组大小大约为 10000kb,按公式 $N = \ln(1 - P) / \ln(1 - f)$ 计算所需要的重组子数,其中 P 为任意一段 DNA 序列在文库中出现的机率, f 为插入片段的长度与基因组总长度的比值, N 为重组克隆总数,则在 6~10kb DNA 片段的基因文库中,使含有一目的 DNA 序列达 99% 的概率($p = 0.99$),所需要的重组子数目约为 7×10^3 。据此,我们建立的基因文库库容已能满足对产甘油假丝酵母 WL2002-5 某一特定基因的克隆。

从基因文库中随机取一支保存管,在不加氨苄青霉素的 LB 平板上涂布,随机挑取 100 个菌落分别在不加氨苄青霉素和补加氨苄青霉素的 LB 平板上点种,培养后见 99% 的菌落含有氨苄青霉素抗性标记。取基因文库 G1 组 20 个单菌落提取质粒 DNA,经电泳鉴定皆含有插入有外源 DNA 的质粒,插入 DNA 片段大小在 6~10kb。

2.2 产甘油假丝酵母胞浆 3-磷酸甘油脱氢酶基因的克隆

将建立的基因库扩增后提纯重组质粒,然后转化 *S. cerevisiae* 642。经 10 批转化试验,共获得转化子 15 株。对它们进行了初步鉴定,发现所有转化子皆带有 his, ade 营养缺陷型标记,而 leu 营养缺陷型标记被恢复。另外,所有转化子都能在含 50g/L 氯化钠的培

培养基上生长,而 *S. cerevisiae*642 不能。表明所获得的转化子来源于 *S. cerevisiae*642 和重组质粒成功地被转入并很可能含有胞浆 3-磷酸甘油脱氢酶编码基因。对转化子中的 0601 进行了进一步鉴定。将转化子 0601 所含质粒提纯并转化入 *E. coli*DH5 α 获得转化子 001,对其中质粒进行提纯和鉴定。结果显示,转化子 001 含有分子大小约为 17kb 的质粒,插入的外源 DNA 片断大小约为 10kb(图 2),进一步将此质粒转入 *S. cerevisiae*642 (*gpd1* Δ 、*gpd2* Δ),发现此质粒能消除由于 *GPD* 基因缺失突变而导致的对渗透压的敏感性(图 3),表明已成功地克隆到产甘油假丝酵母胞浆 3-磷酸甘油脱氢酶基因,将此重组质粒定名为 YEp0601。

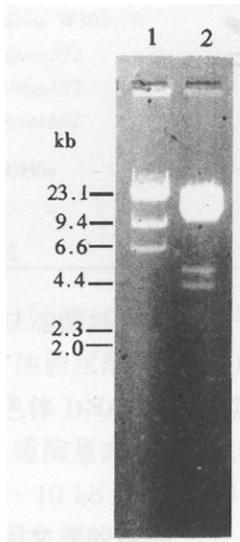


图 2 转化子 001 所含质粒电泳图谱
Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of recombinant plasmid from transformant 001

1. λ DNA/*Hind* III; 2. YEp0601/*Bam* HI.

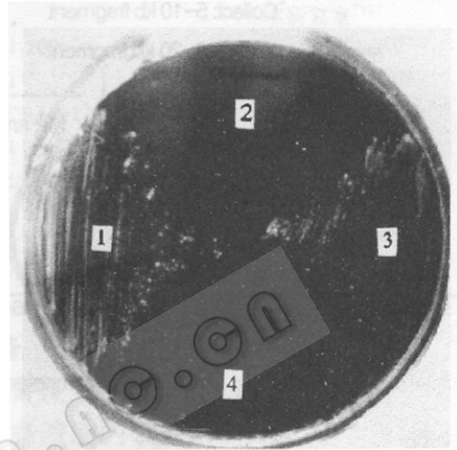


图 3 *S. cerevisiae*642 及其转化子的渗透压敏感性

Fig. 3 Examination of osmosensitivity for *S. cerevisiae*642 and its transformants growing on SD plate containing 50g/L of sodium chloride

1. *S. cerevisiae* W303-1A; 2. *S. cerevisiae* 642 + YEp51;

3. *S. cerevisiae* 642 + YEp0601; 4. *S. cerevisiae* 642.

3 讨论

3-磷酸甘油为细胞质膜组份(甘油磷脂)生物合成所必需,但 *GPD1* 基因的缺失并不导致酵母细胞甘油营养缺陷型的产生,并且, *gpd1* Δ 突变株仍可以产生少量的但足够满足正常生长所需的甘油。因此,酵母细胞至少存在另一个编码 *GPDH* 的基因^[17]。最近, Hohmann 等已成功地克隆出酵母 *GPD2* 基因, *GPD1* 和 *GPD2* 基因同时缺失突变则细胞生长速度显著减慢并表现出渗透压敏感性(私人通信)。*GPD* 基因编码 3-磷酸甘油脱氢酶,此酶催化甘油合成途径中的磷酸二羟丙酮受氢还原为 3-磷酸甘油,为甘油合成途径中的关键限速酶;通过高效表达 *HOG1*、*PBS2* 或 *GPD1* 基因可以提高甘油的产量并提高细胞耐高渗压的能力^[18]。我们运用酿酒酵母 *GPD1* 和 *GPD2* 基因双缺失突变株成功地从产甘油假丝酵母染色体基因文库中克隆出其胞浆 3-磷酸甘油脱氢酶的编码基因,并发现所克隆出的 *GPD* 基因受 *HOG* 途径的调控。最近, *HOG* 途径中的另一重要靶基因

GPP2 已被成功地克隆出^[24]。GPP 基因编码 3-磷酸甘油酯酶,此酶催化 3-磷酸甘油脱磷酸根成甘油。与此同时,不受 HOG 途径调控的 GPD2 和 GPP1 基因也已经被克隆和鉴定^[25]。所有这些将有助于解释为什么某些耐高渗透压酵母在相对低渗的环境中能够产生并分泌高水平的甘油并有可能利用代谢工程理论构建或改造甘油生产菌种。我们将对所克隆出的产甘油假丝酵母胞浆 3-磷酸甘油脱氢酶基因进行亚克隆、序列分析及其调控机制的研究,以期阐明产甘油假丝酵母高产甘油的分子机理并为产甘油假丝酵母的遗传改良提供新的信息。

致谢 本研究进程中瑞典越特堡大学 Stefan Hohmann 博士无偿提供了珍贵的酿酒酵母胞浆 3-磷酸甘油脱氢酶缺陷型突变株并提供大量相关研究最新成果和富有建设性的讨论,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Gsonka L N, Hanson A D. *Annu Rev Microbiol*, 1991, **45**:569~606.
- [2] Csonka L N. *microbiol Rev*, 1989, **53**:121~147.
- [3] Wyn Jones R G. *Recent Adv Phytochem*, 1984, **18**:55~78.
- [4] Yancey P H, Clark M E, Hand S C *et al.* *Science*, 1982, **217**:1214~22.
- [5] Christian J H B, Walko J. *J Gen Microbiol*, 1961, **25**:97~102.
- [6] Epstein W, Schultz S G. *J Gen Physiol*, 1965, **49**:221~234.
- [7] Mareson H R, Hastings J W. *Appl Environ Microbiol*, 1979, **38**:178~180.
- [8] Measures J C. *Nature*, 1975, **257**:398~400.
- [9] Gloux K, le Rudulier D. *Arch Microbiol*, 1989, **151**:143~48.
- [10] Larsen P L, Sydnes L K, Landfald B *et al.* *Arch Microbiol*, 1987, **147**:1~7.
- [11] Imhoff J D F. *FEMS Microbiol Rev*, 1986, **39**:57~66.
- [12] Brown A D, Simpson J R. *J Gen Microbiol*, 1972, **72**:589~591.
- [13] Blomberg A, Adler L. *Adv Microbiol Physiol*, 1992, **33**:145~212.
- [14] Mayer W H, Varela J C S. *Mol Microbiol*, 1993, **10**:253~258.
- [15] Berwster J L, De Valor T, Dwyer N C *et al.* *Science*, 1993, **259**:1760~63.
- [16] Blumer J K, Johnson L g. *TIBS*, 1994, **19**:236~245.
- [17] Albertyn J, Hohmann S, Thevelein J M *et al.* *Mol Cell Biol*, 1994, **14**:4135~4144.
- [18] Nevoit E, Stahl U. *Yeast*, 1996, **12**:1331~37.
- [19] 王正祥, 诸葛健, 方慧英. *微生物学报*, 1999, **39**(1):68~74.
- [20] Rose D M Broach R J. Cloning genes by complementation in yeast. In: Guthrie C, Fink R G ed. *Guide to yeast genetics and molecular biology*, California: Academic Press, Inc., 1991, 195~229.
- [21] Sambrook, J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning-a laboratory manual*, 2nd Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [22] Ito H, Fukuda Y, Murata K *et al.* *J Bacteriol*, 1983, **153**:163~168.
- [23] Beggs J D. *Nature*, 1978, **275**:104~109.
- [24] Norbeck J, Polman A K, Akhtar N *et al.* *Biol Chem* 1996, **271**:13875~81.
- [25] Bjorkqvist S, Ansell R, Adler L *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**:128~132.

CLONING OF A GENE ENCODING CYTOPLASMIC GLYCEROL-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE FROM *CANDIDA GLYCEROLGENESIS*

Wang Zhengxiang Zhuge Jian

(School of Biotechnology, Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036)

Abstract The response of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic stress is to synthesize and accumulate the glycerol in order to increase the internal osmolarity and this response is controlled by the high-osmolarity glycerol (HOG) response pathway, whose important target gene is *GPD1*. The increase of the activity of glycerol-3-phosphate dehydrogenase by over-expression of *GPD1* gene can increase the glycerol yield greatly. In this study, a gene encoding cytoplasmic glycerol-3-phosphate dehydrogenase of *Candida glycerolgenesis* was cloned out by inserting *Sau3AI*-generated chromosomal DNA fragments into the *Bam*HI site of a yeast-*E. coli* shuttle vector, YEp51. Fifteen transformants were isolated on a supplemented minimal medium containing 50g/L of sodium chloride from the constructed *C. glycerolgenesis* genomic library by using genetic complement approach. The recombinant plasmid, YEp0601, from transformant 0601, possessed the genetic markers of YEp51 and was able to restore the osmotolerance of *S. cerevisiae*642(*gpd1* Δ , *gpd2* Δ). These indicated that a gene coding for cytoplasmic glycerol-3-phosphate dehydrogenase of *C. glycerolgenesis* was successfully cloned out.

Key words *Candida glycerolgenesis*, Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, Cloning

* Project of Chinese National Programs for Science and Technology Development (No. 96-C03-03-03)